第 42 卷 第 2 期
1999 年 5 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.42, No.2
May, 1999

引诱茶尺蠖天敌寄生蜂的茶树挥发物的分离与鉴定*

许 宁 陈宗懋 游小清
(中国农业科学院茶叶研究所,杭州 310008)

摘要 采用 Tenax GC 动态吸附法对茶树-茶尺蠖 *Ectropis obliqua* (Prout)-单白绵绒茧蜂 *Apanteles* sp. 三重营养关系中茶树的新梢挥发性化合物进行了捕集,经 GC、GC-MS 鉴定结果表明,不同来源的挥发物的组成和数量是不同的,完整茶树新梢(IS)的挥发物有 11 种组份;机械损伤新梢(MDS)的挥发物有 13 种组份;茶树-茶尺蠖取食复合体(PHC)的挥发物有 15 种组份,而用经典的 SDE 法获得的新梢精油有 13 种组份,4 种挥发物数量的大小顺序为 SDE>MDS>PHC>IS。生物测定结果表明,无气味经历的雌单白绵绒茧蜂对 IS 和 MDS 的气味的选择作用无统计上的显著性,对机械损伤新梢+幼虫口腔分泌物(MDS+Reg),幼虫取食损伤(LDS)和 PHC 的气味有较强的偏好选择性。

关键词 茶树,茶尺蠖,单白绵绒茧蜂,三重营养,挥发物

植物的气味在植食昆虫和天敌昆虫的生境定位、寄生或捕食行为中起着重要的作用[1~2]。一般情况下,植食昆虫往往只取食分类地位上接近的寄主植物[2]。除视觉反应外,寄主植物的气味为植食昆虫确定寄主身份的主要感官刺激物,它可使处于寄主搜索、取食和产卵过程中的植食昆虫产生种种行为反应[3]。与植食昆虫相比,天敌所面临的气味来源更加多样,启动天敌昆虫嗅觉反应的挥发性物质可能起源于寄主植物、寄主昆虫或两者的有机结合[4],所以探明不同来源挥发物的组成是研究三级营养关系化学通讯的先决条件。

在搜寻寄主的过程中,寄生蜂要利用各种各样的与寄主相联系的视觉或嗅觉指示信息才能找到寄主并完成寄生过程。在天敌所处的生境中,能释放挥发物的味源很多,由植物或寄主(丝、粪便、蜕、蛹、卵块)发出的挥发物往往对寄生蜂的成功寄生起到决定作用。从挥发物的量上看,植物型挥发物挥发量多,持续时间长,作用距离大;而寄主型挥发物挥发量少,持续时间短,作用距离小[4]。对于一个进行寄主搜寻的寄生蜂来说,如何利用挥发物提供的信息就成为成功寄生的关键所在。

本研究采用吸附剂的方法动态捕集茶树-茶尺蠖 *Ectropis obliqua* (Prout)-茶尺蠖天敌绒茧蜂 *Apanteles* sp. 三重营养关系中的植源性的挥发物,经解吸附洗脱后通过 GC,GC-MS 进行定性和定量研究,并用生物测定的方法研究各种挥发物对绒茧蜂的活性强弱。

* 国家自然科学基金和浙江省自然科学基金资助项目
1997-06-09 收稿,1998-07-06 收修改稿

1　材料和方法

1.1　材料

茶树：龙井 43 无性系（*Camellia sinensis* cv. Longjing 43）一芽三叶新梢。

虫源：茶尺蠖幼虫，采用以茶树鲜叶为食料室内人工饲养的茶尺蠖幼虫；单白绵绒茧蜂，将室内饲养的初孵茶尺蠖幼虫定点放到茶园中去，8～10 天后从田间捕回继续用茶鲜叶饲养，约 3～7 天后绒茧蜂幼虫陆续从茶尺蠖幼虫体内啮出并结茧。每天15:00～16:00 收集蜂茧，放入 4℃冰箱中冷藏待用。

无经历未交配绒茧蜂：生测前 3～5 天，从冰箱中取出蜂茧，每粒茧分别放入一个指形管中，蜂羽化后在解剖镜下分出雌雄待用。

1.2　试剂和药品

英国产 Tenax GC 60～80 目，使用前用乙醚在索氏（Soxhlet）提取器中反复洄流 48 h，以去除杂质；分析纯乙醚，经全玻璃仪器重蒸后使用；无水硫酸钠；癸酸乙酯。

1.3　仪器和设备

自制 Tenax trap 不锈钢柱（10 cm×15 mm）；Soxhlet 提取器；抽气泵；水蒸气蒸馏萃取（SDE）装置；电热恒温水浴锅；HP5790 气相色谱仪（专用于活化 Tenax trap）；岛津 GC-9A 气相色谱仪；GC-MS 为 HP-5890A 气相色谱仪联用 HP5972MSD 质谱仪。

1.4　挥发物的搜集

1.4.1　SDE 法：用 SDE 装置沸水抽提 50 g 茶树新梢的挥发物 30 min，乙醚用量为 25 mL。提取完毕后加入适量无水硫酸钠置于冰箱中过夜以除去乙醚中的水份，浓缩前加入 1.0 mL 50 μg/mL 的癸酸乙酯作为内标，水浴（50℃）下浓缩至一定体积后（约 1 mL）再用吹送洁净空风法浓缩成约 20 μL 精油待用。

1.4.2　Tenax trap 动态捕集法：参照 Buttery 等（1982）的方法并采用自行设计的装置进行茶树新梢挥发物的动态捕集[5]。将1 000 g茶树新梢置于 60 L 玻璃容器中，新梢基部用湿润脱脂纱布覆盖保鲜，进气口空气经活性炭过滤后进入容器中，把在 HP 气相色谱仪经 275℃高温通氮活化 6h 的填有 5.0 g Tenax GC 的不锈钢柱连接到的出气口，连续抽气 24 h，抽气速度控制在 100 mL/min。用 100 mL 重蒸乙醚洗脱 Tenax 柱，洗脱液的后续处理步骤同 SDE 法。

1.5　动态捕集茶树新梢挥发物的处理

完整新梢（intact tea shoots，IS）：用 1 000 g 新梢直接收集挥发物；机械损伤新梢（mechanically damaged shoots，MDS）：用剪刀将1 000 g新梢剪碎后收集挥发物；植物-害虫取食复合体（plant-host feeding complex，PHC）：让 4 龄茶尺蠖幼虫 100 头取食1 000 g新梢，收集取食过程中 PHC 释放的挥发物。

1.6　GC 与 GC-MS 操作条件

GC：50 m×0.2 mm PEG-20 M 石英毛细管柱；其程序升温 50～190℃，2℃/min（保持

30 min)；FID检测器；载气为氮气；CR-2AX色谱处理机。

GC-MS：50 m×0.2 mm PEG-20 M石英毛细管柱；分流比1∶30；进样口温度200℃；GC/MS接口温度：280℃，柱温50～190℃，2℃/min，电离能为70 eV；载气：99.9995%氦气。

1.7 挥发物的定量和定性

用各挥发物GC的峰面积与内标（癸酸乙酯）的峰面积的比值进行相对定量；采用标准化合物和GC-MS结果（EI条件下）对每一质谱峰与标准化合物的质谱峰进行联机检索定性。

1.8 绒茧蜂对不同挥发物的行为反应生测

1.8.1 材料处理：（1）完整新梢（IS）4支（约3.5 g）新梢基部插入青霉素小瓶中，加自来水保鲜，叶片保持完整无损；（2）机械损伤新梢（MDS）用打孔器（1.0 cm）对新梢叶片打孔，使之形成机械损伤。打孔方式采用在叶缘处打孔，形成半圆形切口，以模拟虫取食损伤状，MDS总重控制在3.5 g左右；（3）机械损伤新梢+茶尺蠖幼虫（MD shoots treated with regurgitate，MDS+Reg）用血色素吸管吸取茶尺蠖幼虫（3龄末期）口腔分泌物40 μL，立即涂于MDS的伤口处；（4）害虫取食新梢（larval damaged shoots，LDS）从幼虫取食损伤的新梢上移去幼虫，并用毛笔扫去丝及粪便；（5）植物+害虫取食复合体（PHC）将8条饥饿茶尺蠖幼虫（3龄）放到完整新梢上，使之保持旺盛取食状态。

上述各处理新梢均从茎切口端插入青霉素小瓶中并加入适量水保鲜，一方面使其保持自然状态，另一方面防止气味从茎切口处溢出。

1.8.2 生测装置：采用自行设计的“Y”形嗅觉仪测定绒茧蜂对不同处理新梢气味的行为反应（图1）。“Y”管臂长10 cm，内径1.0 cm，两臂夹角90°，释放管长10 cm，接口均为标准14号磨口。生测时将一25W白炽灯平行置于“Y”管上方20 cm处，每个管臂用Teflon管各自连接一特制的味源瓶。两个味源瓶一个用于空白对照，一个用于承装不同处理的新梢。进入味源瓶的空气首先经活性炭过滤后再进入蒸馏水加湿瓶以湿化空气。抽气口连接在“Y”管释放臂处，调节抽气速度为150 mL/min。

1.8.3 生物测定：将每头绒茧蜂单独从释放口用一小的释放管引入，待虫从小管中爬出后计时5 min，记录进入两管虫的数量和每头蜂从释放到达目的味管臂所需的时间。在释放臂上停留5 min仍不活动的蜂记为不反应。每个处理至少生测20头蜂。每次处理毕用洗涤剂彻底清洗生测装置，100℃烘干，以消除不同处理间残留气味的影响。每测定10头蜂时调换一下“Y”管两臂的方向，用以消除几何位置对绒茧蜂行为可能产生的影响。生测时间安排在9:00～15:00进行。

1.8.4 数据统计：用 χ^2 法检验绒茧蜂在两味源间是否呈假设检验 H_0 为50∶50（假定总数为100）的理论分布，计算 χ^2 值和相应的显著性水平 P 值。

2 结果与分析

结果表明，茶树的挥发物主要由脂肪醇、醛、酯类化合物，萜烯醇化合物和杂环化合物等组成，新梢挥发物组成随来源和收集方式不同而异（表1）。SDE法和3种处理所得挥发物

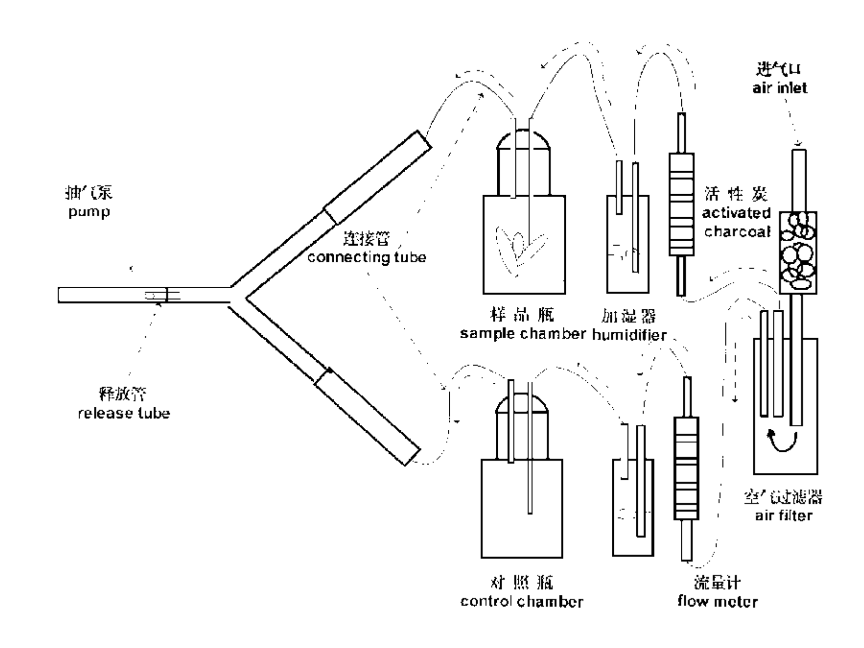


图 1　“Y”形嗅觉仪示意图

Fig.1　“Y”-tube olfactometer

的组成和含量差异较大，有 13 种组份被检出，主要以高沸点挥发物为主，其中 Z-2-penten-1-ol、linalool、phenylacetanitrile 和 Z-3-hexen-1-ol 等含量较高；IS 挥发物以低沸点为主，共有 11 种组份，主要有 n-pentanol、Z-2-penten-1-ol、E-2-pentenal 和 1-penten-3-ol；MDS 挥发物有 13 种组份检出，以 Z-2-pente-1-ol 含量最高，其次为 n-pentanol、Z-3-hexen-1-ol 和 n-hexanal；PHC 挥发物中的组份最多，共有 15 种组份被检出，以 Z-2-penten-1-ol 含量最高，其次为 E-2-pentenal、n-hexanal 和 indole；IS、MDS 和 PHC 挥发物中 C_5、C_6 醛含量的大小为 PHC>MDS>IS。

生物测定结果表明，雌绒茧蜂对完整新梢和机械损伤新梢的

表 1　不同处理茶树新梢挥发物的组成和相对含量

Table 1　Volatile composition from various treated tea shoots and relative contents

组分 Components	水蒸气蒸馏萃取 SDE	完整新梢 IS	机械损伤新梢 MDS	植物-害虫取食复合体 PHC
n-hexanal		0.001	0.23	0.1
E-2-pentenal		0.13	0.001	0.23
1-penten-3-ol	0.01	0.09	0.001	0.03
E-2-hexenal			0.03	0.02
n-pentanol		0.45	1.46	trail
Z-2-penten-1-ol	6.78	0.24	5.75	0.62
Z-3-hexen-1-ol	0.86	0.02	0.31	0.04
linalool oxide (f)	0.29		0.05	0.03
heptanol	0.14			
linalool oxide (p)	0.21		0.03	0.001
linalool	3.31	0.05	0.05	0.03
Z-3-hexenyl acetate	0.65			
methylsalicylate	0.2	0.05		0.02
geraniol	0.64	0.001		0.001
phenylacetanitrile	2.42	0.03		trail
nerolidol	0.53			
dihydroactinidiolide	0.11	0.02	0.02	0.02
indole			0.06	0.07

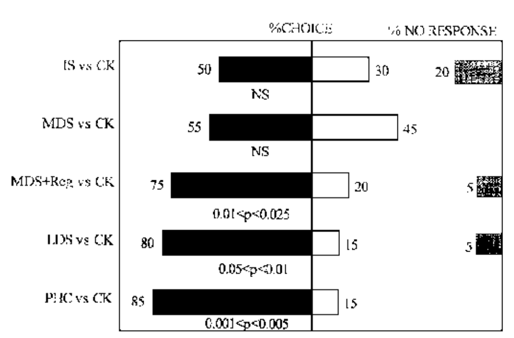


图2 无经历未交配雌绒茧蜂对不同挥发物的选择作用

Fig.2 Selection of inexperienced virgin female *Apanteles*. sp. to different odors

气味与洁净空气相比几乎无选择上的差异性，其 χ^2 值无统计上的差异显著性。MDS+Reg，LDS 和 PHC 的气味对雌性绒茧蜂有较强的引诱作用（图2），其 χ^2 值均达到统计上的差异显著性。说明茶树所释放的有活性的挥发性气味只有在茶尺蠖参与下才能诱发出来。

3 讨论

本实验结果表明，从相对含量上看，C_5、C_6 化合物是茶树新梢挥发物的主体，新梢受机械损伤后许多挥发物的释放量（如 Z-3-hexen-1-ol）大量增加，这与 Saijo 等（1975）用 ^{14}C 的研究结果相吻合[6]。新梢受伤（MDS，PHC）后萜烯类和芳香类挥发物（如 linalool oxide（p）、geraniol 和 methyl salicylate）的种类比 IS 挥发物增加，这与 Dicke（1994）认为的植物受伤后会增加释放此类挥发物的观点一致[7]。用 SDE 法抽提的挥发物中有些组份是 IS、MDS 和 PHC 的 Tenax trap 捕集物所没有的，如 heptanol、Z-3-hexenyl acetate 和 nerolidol，这些挥发物可能是鲜叶在沸水抽提过程中的化学反应产物（如结合态糖苷的水解、酯化产物）。IS、MDS 和 PHC 的 Tenax trap 捕集物中也有用 SDE 挥发物中所没有的组份，如 n-hexanal、E-2-pentenal、E-2-hexenal、n-pentanol 和 indole。由此可见，SDE 法对茶梢挥发物中的低沸点、小分子挥发性化合物的收集能力不及 Tenax trap 法，所以，以 SDE 抽提的挥发物进行昆虫行为生测难以确切反应寄主植物挥发物的真实情况。Buttery 等（1982）认为用 Tenax 吸附剂的分析结果可以真实地反映昆虫所接触的植物周围大气的挥发物的特征[5]。一般情况下，被 Tenax 吸附剂捕获的挥发物在室温下可保存 2 个星期而不会解吸附，吸附后的 Tenax 在 0℃ 至室温下保存数周对结果的重现性无甚影响[8~9]，但该法捕集挥发物前必须要预先对 Tenax 进行高温活化，同时通以高纯载气以热解析吸附剂上的杂质。

生测结果表明，茶尺蠖单白绵绒茧蜂对各种来源的挥发物有不同的生物活性，最有活力的挥发性互利素为茶树+茶尺蠖幼虫取食复合体所释放的气味。分析结果表明，PHC 挥发物的 GC 与 IS 和 MDS 的差异较大，醛类挥发物的总量为 PHC＞MDS＞IS，LDS 和 MDS+Reg 的气味具有与 PHC 气味相似的效应。因此可以认为，茶树-茶尺蠖-绒茧蜂三重营养关系中，导致寄生蜂成功搜索的挥发性信息化合物是由茶树产生的植物型挥发物，特别是醛类挥发物在此过程中可能起着重要的作用。这种有生物活性的挥发物必须由植物-植食昆虫的交互作用才能释放出，茶尺蠖的口腔分泌物可能是导致这种挥发物产生的直接原因，存在于茶尺蠖的口腔分泌物中的诱导茶树释放挥发性互利素的启动子的作用机制尚待进一步研究。

致谢 本研究由浙江省大型精密仪器协作公用办公室提供部分资助，在此深表感谢！

参 考 文 献 (References)

1 Vinson S B. Habitat location. In: Nordlund D A, Jones R, Lewis W J (eds.) Semiochemicals: Their Role in Pest Control. New York: John Wiley & Sons, 1981, 51～68

2 Visser J H. Host odor perception by phytophagous insects. Annu. Rev. Entomol., 1986, 31: 121～144

3 Dethier V G. Mechanism of host-plant recognition. Entmol. Exp. & Appl., 1982, 31: 49～56

4 Vet L E M, Dicke M. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. Annu. Rev. Entomol., 1992, 37: 141～172

5 Buttery R G, Ling L C, Wellso S G. Oat leaf volatiles: Possible insect attractants. J. Agric. Food Chem., 1982, 30: 791～792

6 Saijo R, Takeo T. Increase of cis-3-hexen-1-ol content in tea leaves following mechanical injury. Phytochemistry, 1975, 14: 181～182

7 Dicke M. Local and systemic production of volatile herbivore-induced terpenoids: Their role in plant-carnivore mutualism. J. Plant. Physiol., 1994, 143: 465～472

8 Zlatkis A, Bertsch W, Lichtenstein H A *et al*. Profile of volatile metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry. Anal. Chem., 1973, 45: 763～766

9 Zlatkis A, Lichtenstein H A, Tishbee A *et al*. Concentration and analysis of volatile urinary metabolites, J. Chromatog. Sci., 1973, 11: 299～303

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF TEA PLANT VOLATILES ATTRACTIVE TO TEA GEOMETRID PARASITOIDS

Xu Ning　　Chen Zongmao　　You Xiaoqing

(Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou　310008)

Abstract　The volatiles emitted from the various treated tea shoots were dynamically entrapped by Tenax GC and identified by GC and GC-MS. Results showed that the volatiles emitted from various treated tea shoots differed in composition and relative contents. Volatile emitted from intact tea shoots (IS) was composed of a blend of 11 components; while volatile emitted from mechanically damaged tea shoots (MDS) was a blend of 13 components and volatile from plant host feeding complex (PHC) was a blend of 15 components. Volatile extracted from tea shoots by SDE method was identified to be a blend of 13 components. The order of relative contents from above treatments is SDE＞MDS＞PHC＞IS. Y-tube olfactometer bioassay results showed that inexperienced female wasps had no preference to volatiles emitted from IS and MDS over clean air (control) statistically, while strong preference to volatiles emitted from MDS＋Reg, LDS, and PHC over control was observed.

Key words　tea plant, tea geometrid, *Apanteles* sp., tritrophic system, volatile